Untersuchungen in vitro über Glykogengehalt und Retraktionsvermögen von Schweinethrombozyten

Wolfgang Littmann

1962

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
Direktor: Professor Dr. O. Eichler

Vorgelegt beim Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. Karl Zipf

Untersuchungen in vitro über Glykogengehalt und Retraktionsvermögen von Schweinethrombozyten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Wolfgang Littmann
aus
Leipzig

München 1962

Dekan: Professor Dr. K. Ullrich

Referent: Professor Dr. K. Zipf

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juli 1962

Uni-Druck München

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
E i n l e i t u n g	1
M e t h o d i k :	
A. Blutgewinnung und Isolierung der Thrombozyten	5
B. Glykogenbestimmung	6
C. Bestimmung der Retraktion nach MACFARLANE	8
E r g e b n i s s e :	
A. Der Glykogengehalt in Schweine-thrombozyten nach Extraktion mit Trichloressigsäure bzw. Kalium-hydroxyd im Vergleich	9
B. Der Glykogengehalt in Thrombozyten unter verschiedenen Bedingungen	13
C. Die Retraktion in Zusammenhang mit dem Glykogengehalt	26
D i s k u s s i o n	32
Zusammenfassung	40
Literaturnachweis	41

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

E i n l e i t u n g

Im Laufe des letzten Jahrzehntes mehrten sich durch biochemische Arbeiten Hinweise, die für eine große Stoffwechselintensität der Thrombozyten sprechen. Noch die 1954 erschienene Monographie von MAUPIN enthält keinerlei Angaben über einen Stoffwechselumsatz in den Blutplättchen. Es wird im Gegenteil ein Zitat von ALEXANDER (1953) wiedergegeben, das ein Stoffwechselgeschehen in den Thrombozyten als fragwürdig beurteilt. Zu dieser Zeit war über ihre chemische Zusammensetzung nahezu nichts bekannt. Erst nachdem sich herausstellte, daß in den Plättchen ein überraschend hoher ATP-Gehalt vorhanden ist (BESTETTI und CROSTI 1955; BORN 1956), begann man, sich für den Stoffwechsel dieser Blutelemente zu interessieren. Auf Grund des hohen ATP-Bestandes wurde besonders der Energiestoffwechsel Gegenstand von Untersuchungen.

Es handelt sich bei den Thrombozyten wie bei den Erythrozyten um kernlose Gebilde mit einem Stoffwechselumsatz, der aber nach WALLER u. Mitarbeiter denjenigen der roten Blutkörperchen um ein Vielfaches übertrifft. So liegt der ATP-Gehalt der Plättchen, bezogen auf das Gesamtprotein, etwa 25 mal höher als in den Erythrozyten. Die gleichen Autoren haben außerdem zahlreiche Fermente der Glykolyse, des Pentosephosphat- und Zitronensäurezyklus, der Atmungskette, der Phosphatspaltung und der Transaminierung qualitativ nachgewiesen und ihre Aktivität bestimmt.
Die Verteilung der Enzyme weist eine gewisse Analogie zur Herzmuskulatur auf. Für das Überwiegen des Kohlenhydratstoffwechsels spricht die Tatsache, daß der respiratorische Quotient der Bluttplättchen 1,1 beträgt. Da der Gehalt an glykolytischen Enzymen wesentlich höher

ist als der Gehalt an Enzymen des oxydativen Kohlenhydratabbaues, ist anzunehmen, daß die Glykolyse überwiegt.

Die Bezeichnung der Blutplättchen als Thrombozyten erscheint zwar nicht gerechtfertigt, da es sich um keine vollständigen Zellen mit Kern und Plasmaleib handelt. Mit den in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnissen ist es jedoch unvereinbar, die Plättchen als inerte, abgeschnürte Plasmabruchstücke der Megakaryozyten darzustellen.

Über den Glykogengehalt in Thrombozyten ist bisher nur wenig bekannt geworden. Histochemisch wurde von WISLOCKI u. Mitarbeitern (1949), GIBB und STOWELL (1949), STORTI u. Mitarbeitern (1953) und HECKNER (1956) Glykogen qualitativ nachgewiesen, während WAGNER (1946) und ZINGONI (1952) kein Glykogen finden konnten. WALLER u. Mitarbeiter geben den Glykogengehalt in menschlichen Thrombozyten nach enzymatischer Bestimmung mit 5 mg pro g Frischgewicht an. WOODSIDE und KOCHOLATY untersuchten die Kohlenhydrate in Thrombozyten und fanden für Glykogen einen Anteil am Trockengewicht der Plättchen von 2,34% beim Menschen und von 2,26% beim Rind. Es ergab sich weiterhin, daß das Glykogen damit etwa die Hälfte der Gesamtkohlenhydrate in den Thrombozyten ausmacht. Diese überraschend hohen Glykogenwerte, die etwa auch in der Skelettmuskulatur vorliegen, konnten in Vorversuchen am hiesigen Institut bestätigt werden.

Es erhebt sich nun die Frage, in welchem Zusammenhang mit physiologischen Aufgaben der weit über den Eigenbedarf der Plättchen hinausgehende, energieliefernde Kohlenhydratstoffwechsel steht. Es war naheliegend, die Retraktion als stark energieverbrauchende Funktion in Zu-

sammenhang mit dieser Stoffwechselintensität zu bringen. LÖHR u. Mitarbeiter analysierten die Beziehungen zwischen dem Energiestoffwechsel normaler menschlicher Thrombozyten und der Retraktion des Blutes. Die Glykolyse wurde gehemmt durch Monojodacetat und Natriumfluorid, der Zitronensäurezyklus mit Malonat und die Atmungskette mit Zyanid. Diese Vergiftungen führten zu einer Aufhebung der Retraktilität und gingen mit einem ATP-Abfall in den Thrombozyten einher. Besonders empfindlich zeigte sich die Retraktion gegen Glykolysegifte. Diese Befunde sprechen für eine Abhängigkeit der endergonischen Retraktion von den energieliefernden Reaktionen des Kohlenhydratstoffwechsels.

Auf Grund dieser Erkenntnisse schien es uns wünschenswert, das Hauptreservoir des Kohlenhydratstoffwechsels, das Glykogen, einer genaueren Analyse zu unterziehen. Die Schwierigkeit für die Glykogenbestimmung bestand zunächst in der Auswahl der Extraktionsart, da in der Literatur keine einheitliche Auffassung über die Bestimmung des wahren Glykogengehaltes besteht. Während mit 30%iger KOH sämtliches Glykogen extrahiert werden soll - es werden dabei aber auch andere Substanzen mit erfaßt - sind es nach BLOOM u. Mitarbeitern bei der Trichloressigsäureextraktion unter günstigsten Bedingungen nicht mehr als 85%. Einige Autoren unterscheiden daher nach WILLSTÄTTER und ROHDEWALD (a) ein Lyoglykogen von einem Desmoglykogen, das mit unlöslichen Proteinen verbunden sein soll.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst festgestellt werden, ob die von LÖHR u. Mitarbeitern und von WOODSIDE und KOCHOLATY in den Thrombozyten erhaltenen hohen Glykogenwerte bestätigt werden können. Weiterhin sollte geprüft werden, inwieweit eine Abhängigkeit des Glykogengehaltes der Blutplättchen vom umgebenden Milieu und den angewandten

Bedingungen besteht. Dazu wurden die gewaschenen Thrombozyten in bestimmten Suspensionsmedien bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten inkubiert und nach bestimmten Zeiten auf ihren Glykogengehalt untersucht. Durch gleichzeitige Prüfung der Retraktionsfähigkeit dieser Thrombozyten hofften wir, Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, ob und wenn ja, in welchem Ausmaße ein Zusammenhang zwischen dem Retraktionsvermögen und dem Glykogenbestand der Thrombozyten vorhanden ist.

M e t h o d i k

A. Blutgewinnung und Isolierung der Thrombozyten

Von Schlachtschweinen beiderlei Geschlechts wurde das Blut gewonnen. Im Strahl aus der Wunde fließend, wurde es in silikonierten 1-l-Gefäßen, die 100 ml einer 1,7%igen Titriplex-III-Lösung+) mit 0,9% NaCl enthielten, aufgefangen (Verhältnis Blut : Titriplex-Lösung etwa 9 : 1).

Zur Sedimentierung der Erythrozyten und Leukozyten zentrifugierten wir diese Blutmischungen in einer Christ-Kühlzentrifuge 5 min. bei etwa 2200 g und 4° C. Der thrombozytenhaltige Plasmaüberstand wurde in eine Plastikflasche abgesaugt und bei 4° kühl gehalten. Anschließend wurden die Thrombozyten durch 20 min. Zentrifugieren (zunächst 5 min. bei 2200 g zum Absetzen der restlichen Erythrozyten und Leukozyten, dann 15 min. bei 4600 g) abgesetzt und nach Absaugen des Plasmas in vorgekühlte physiologische Kochsalzlösung, die 0,1% Titriplex-III enthielt, gebracht. Nach einmaligem Waschen mit dieser physiologischen Kochsalzlösung gelangten die Thrombozyten in das entsprechende Medium und wurden nach Ablauf der Inkubationszeit ein zweites Mal abzentrifugiert. Alle Inkubationsmedien enthielten einen gewissen Titriplex-III-Gehalt: Bei den Elektrolytlösungen wurde jeweils 1 mg Titriplex III/ml zugesetzt, im Plasma befand sich die anfangs zur Verhütung der Blutgerinnung zugegebene Titriplexmenge. Eine Ausnahme bildeten lediglich die im Ergebnisteil unter Ziffer II/1c zitierten, mit Na-Citrat als Antikoagulans durchgeführten Versuche. In diesem Fall wurde der NaCl-Lösung bei der Inkubation kein Titriplex zugefügt. Ein kleiner Teil der Plättchen wurde ohne Inkubation sofort anschließend ein zweites Mal gewaschen. Die von diesen Thrombozyten ermittelten Werte wurden als Glykogengehalt der frischen Blutplättchen angesehen.

+) Titriplex III: Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure der Fa. Merck, Darmstadt.

B. Glykogenbestimmung

1. Bestimmung durch Trichloressigsäure-Extraktion nach J. van der VIES.

Von der abzentrifugierten, feuchten Thrombozytenmasse wurde etwa 1 g zu 4 ml 5%iger Trichloressigsäure eingewogen, in einem Teflonhomogenisator zertrümmert und in der Servall-Zentrifuge abgesetzt. Da nach ROE und Mitarbeitern dem Homogenisieren eine entscheidende Bedeutung bei der Extraktion beigemessen wird, wie wir es durch fraktioniertes Homogenisieren bestätigen konnten, wurde unser TCE- +) Präzipitat, wie im folgenden beschrieben, insgesamt 4 mal homogenisiert. Der Überstand nach dem ersten Zentrifugieren kam in einen 20 ml Meßkolben. Das Sediment versetzten wir erneut mit 3 ml 5%iger TCE, gaben es in den Homogenisator und spülten das Zentrifugenglas mit 1 ml TCE nach. Es wurde erneut homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand im Meßkolben gesammelt. Auf diese Weise extrahierten wir 4 mal mit TCE und überführten den Überstand des Homogenisates in den Meßkolben. Das Potterglas wurde mit 4 ml TCE nachgespült, die ebenfalls in den Meßkolben kamen. Wir füllten den Meßkolben nun auf 20 ml mit TCE auf und zentrifugierten den Inhalt.

Zur weiteren Glykogenbestimmung wurden 2 ml dieses Überstandes in einem 20 ml Meßkolben mit 2 ml 10-n-KOH 1 Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen gaben wir 1 ml Eisessig zu, um den Überschuß an Alkali zu neutralisieren und füllten dann mit H_2O bis zur Marke auf.
Es wurde gemischt und 2 ml zu 4 ml im Eisbad vorgekühlten Anthronreagenz (0,5 g Anthron auf 250 ml 95%ige H_2SO_4) hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen erhitzten wir 10 min. im kochenden Wasserbad und lasen die Extinktion nach 30 min. bei 620 mμ gegen einen Leerwert von Trichloressigsäure ab.

+) Trichloressigsäure

2. Bestimmung durch Kaliumhydroxyd-Extraktion nach J. FONG, F.L. SCHÄFFER und P.L. KIRK.

Die Thrombozyten kamen nach zweimaligem Waschen in ein Wägeschälchen und trockneten bei 105° im Wärmeschrank über Nacht. Diese Plättchenmasse wurde eingewogen (ca 1 - 3 mg), mit 0,035 ml 30%iger KOH versetzt und für 30 min. in ein kochendes Wasserbad gebracht. Nach Abkühlung wurden 0,1 ml H_2O und 0,04 ml K_2SO_4 zugegeben, sodann das Glykogen mit 0,4 ml Äthanol gefällt, indem wir nach der Äthanolzugabe gründlich mischten und 5 min. im Wasserbad bei 65° erwärmten. Das Filtrat wurde anschließend zentrifugiert und der Überstand abgehoben. Es folgte eine Waschung mit 0,1 ml 65%igem Alkohol, die sich mit 0,1 ml Äthanol wiederholte. Der Überstand wurde abgesaugt und der restliche Äthanol im Wärmeschrank bei 105° in einer Stunde evaporiert. Dann lösten wir das Präzipitat in 0,4 ml H_2O auf. Die nun folgende Anthronzugabe (37,5 mg Anthron zu 25 ml 95%iger H_2SO_4) mußte sehr exakt und gleichmäßig durchgeführt werden. Wir gaben 1 ml Anthron in 30 sec. zu und mischten dann gründlich durch gleichmäßiges Schütteln. Das Gemisch wurde nun sofort für 4 1/2 min. in ein kochendes Wasserbad gebracht und anschließend im Wasserbad von Zimmertemperatur gekühlt. Nach Zugabe von 1,6 ml eines Reagens (20 ml H_2O, 50 ml 95%ige H_2SO_4) mischten wir gründlich und lasen die Extinktion bei 620 mμ gegen einen Leerwert, den dieses Reagens bildete, ab.

C. Bestimmung der Retraktion nach MACFARLANE

Die Prüfung der Retraktion wurde parallel zu den Glykogenbestimmungen durchgeführt. Ein graduiertes 10 ml Röhrchen mußte vorher intensiv ausgeglüht werden, um das Ankleben von Fibrinfäden am Glas zu verhindern. Zu 3 ml thrombozytenfreiem Plasma, das wir bei 4^{o} aufbewahrten, wurden ca 20 mg Thrombozyten eingewogen, 2 ml einer $CaCl_2$-Lösung (0,024 M) zugegeben und das Retraktionsröhrchen auf 10 ml mit thrombozytenfreiem Plasma aufgefüllt. Wir mischten und verschlossen das Glas mit einem Gummistopfen, der von einem dünnen Draht durchbohrt war. Am Ende des Drahtes, kurz über dem Gefäßboden, befand sich ein Halteknopf, an dem sich die Fibrinfäden abscheiden sollten. Das Röhrchen brachten wir zur Beschleunigung der Retraktion in einen Wärmeschrank bei 37^{o}. Nach 1 1/2 Stunden wurde der Gummistopfen mit dem Draht, an dem sich das Fibrin angelagert und retrahiert hatte, herausgezogen und der Plasmarückstand abgelesen. Die Retraktionsgröße bestimmten wir volumetrisch, indem die Menge des Plasmarückstandes als Maß des Retraktionsvermögens diente.

E r g e b n i s s e

A. Der Glykogengehalt in Schweinethrombozyten nach Extraktion mit Trichloressigsäure bzw. KOH im Vergleich

Mehrere Autoren unterscheiden bei der Glykogenbestimmung mit Trichloressigsäure von Muskel- und Lebergewebe ein Desmo- und Lyoglykogen, da nach der Extraktion mit KOH bzw. TCE keine übereinstimmenden Resultate erzielt werden können. Um zu prüfen, ob diese Unterscheidung auch für Schweinethrombozyten zutrifft, stellten wir einen Vergleich zwischen der KOH- und TCE-Methode an. Zunächst überprüften wir die Angabe von ROE und Mitarb., die dem Homogenisieren eine große Bedeutung für die Erfassung des gesamten Glykogenbestandes beimessen. Da uns aber ein so hochtouriger Homogenisator, wie ihn diese Arbeitsgruppe benutzte, nicht zur Verfügung stand, haben wir mehrere Nachextraktionen mit jeweils sorgfältiger Homogenisierung durchgeführt.

ROE und Mitarb. hatten, ebenso wie eine Reihe anderer Untersucher, zunächst angenommen, daß die nach der KOH-Extraktion gemessenen Glykogenwerte durch Verunreinigung mit reduzierenden oder anderen, die quantitative Bestimmung störenden Substanzen verfälscht seien, und haben diese Ansicht durch experimentelle Befunde stützen können. Dieselben Autoren hatten auch schon in früheren Publikationen darauf hingewiesen, daß die Art der Homogenisierung für die Höhe der Absolutwerte von entscheidender Bedeutung ist. In der letzten aus dem Arbeitskreis um ROE publizierten Arbeit geht aber hervor, daß keine Unterschiede zwischen den nach KOH- bzw. TCE-Extraktion gemessenen Glykogenwerten bestehen, wenn das Homogenisieren unter bestimmten Bedingungen ausgeführt wird. Dies ist unseres Wissens das erste Mal, daß unter allen geprüften Bedingungen (verschiedene Organe, normal ernährte und hungernde Tiere) eine Übereinstimmung der mit beiden Methoden gefundenen Werte erreicht wurde. Verständlicherweise verwerfen ROE und Mitarb. auf Grund ihrer Ergebnisse die von den meisten Untersuchern getroffene Unterscheidung von zwei Glykogenfraktionen, die durch verschiedene Bindungsarten an Proteine oder andere Zellbestandteile erklärt werden. Die Frage, ob zwei oder mehr sich funktionell unterscheidende Glykogenfraktionen in vivo vorliegen, ist damit zunächst nicht berührt. Sie ist von einigen Autoren (KEMP u. KITS van HEIJNINGEN; RUSSEL u. BLOOM u.a.m.) bejaht worden, allerdings auf Untersuchungen basierend, bei denen die beiden Fraktionen durch KOH- und TCE-Extraktion getrennt worden waren. Ergebnisse von Versuchen,

die mit radioaktiv markierter Glucose durchgeführt wurden (DRATZ u. Mitarbeiter; LOURAU u. MEYER; STETTEN u. Mitarbeiter; u.a.m.), scheinen auf eine funktionelle Verschiedenheit des Glykogenpools hinzuweisen, bedürfen aber weiterer Bestätigung und Nachprüfung. Eine einheitliche Auffassung hat sich bis heute noch nicht durchgesetzt. Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang Angaben von MORITZ u. MUNCK, nach denen Glykogen aus Lebern fastender Ratten mit KOH extrahiert, deutlich tiefere Werte nach Hydrolyse und anschließender Bestimmung durch Glucose-Oxydase liefert als bei Messung mit Anthron. In beiden Fällen war zuvor die Alkoholfällung zwischengeschaltet worden.

Wir fanden, daß bei einmaligem Homogenisieren nur 83% der Glykogenmenge extrahierbar war, die nach viermaligem Homogenisieren analysiert wurde. Die Ergebnisse, die bei der fraktionierten Glykogenbestimmung erhalten wurden, sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Extraktion	Glykogen mg	Anteil am Gesamtglykogen %
1.	1,64	83
2.	0,25	13
3.	0,05	2
4.	0,04	2

Tabelle 1

Übersicht über die Glykogenmengen, die bei fraktionierter Extraktion der Plättchenmasse gefunden wurden. Als Gesamtglykogen wurde die Summe des nach den 4 Extraktionen erhaltenen Glykogen bezeichnet.

Wir können damit die Angaben von ROE und Mitarbeitern bestätigen, wonach die Art der Homogenisierung mitentscheidend für die analysierte Gesamtmenge ist. Demnach muß bei Vergleichen der KOH- mit der TCE-Extraktion der Rückstand der TCE-Fällung wiederholt behandelt werden. Eine viermalige Extraktion scheint uns ausreichend zu sein.

Bei der Untersuchung von 30 Schweinen ergab sich nach TCE-Extraktion ein mittlerer Glykogengehalt von $2{,}10 \pm 0{,}11\%$ [1], bezogen auf das Gewicht der getrockneten Plättchenmasse. Das Trockengewicht wurde nach Trocknen der feuchten Thrombozytenmasse über Nacht im Trockenschrank bei 105° bis zur Gewichtskonstanz ermittelt. Aus 33 Bestimmungen errechneten wir einen Mittelwert von $12{,}0 \pm 0{,}23\%$. Für die Berechnung des Glykogengehaltes wurde entweder dieser Mittelwert eingesetzt, meistens aber das jeweils direkt bestimmte Trockengewicht verwendet.

Bei 6 Schweinen bestimmten wir den Glykogengehalt parallel nach beiden Methoden. Es ergab sich hierbei ein Glykogenbestand von $2{,}37 \pm 0{,}21\%$ der getrockneten Plättchenmasse nach KOH-Extraktion. Dagegen wurden nur $1{,}95 \pm 0{,}19\%$ Glykogen nach der TCE-Extraktion, bezogen auf das Trockengewicht, gefunden. Wenn man die bei der KOH-Extraktion erhaltenen Werte als den wahren Glykogengehalt ansieht, so wurden nach der TCE-Extraktion nur 82% Glykogen festgestellt. Auch in den Untersuchungen von WOODSIDE und KOCHOLATY über den Glykogengehalt von Menschen- und Rinderthrombozyten zeigten die nach der TCE-Extraktion erhaltenen Werte einen geringeren Glykogengehalt als nach der KOH-Extraktion. Er betrug im ersten Fall nur rund 50% des Wertes nach dem Kochen mit Alkalilauge. Es besteht also keine Übereinstimmung zwischen diesen Ergebnissen und den unsrigen, obwohl WOODSIDE und KOCHOLATY ebenfalls viermal extrahierten und sogar ultraschallbehandelte Thrombozyten-Suspensionen verwendeten. Ob die Ursache dafür in speciesbedingten Unterschieden zu suchen ist, oder ob dabei methodische Gegebenheiten eine Rolle spielen, können wir nicht sagen. Immerhin ist zu diskutieren, daß durch die Ultrabeschallung der Thrombozyten-Suspension, die von WOODSIDE und KOCHOLATY nur vor der Extraktion mit TCE ausgeführt wurde, die räum-

---

1) Mittlerer Fehler des Mittelwertes

liche Trennung von Enzymsystemen durch Zusammenbruch der Zellstruktur aufgehoben wird und so ein schnell ablaufender Glykogenabbau in Gang kommen könnte.

Gegen die kritiklose Anwendung der KOH-Extraktion sind Einwände zu berücksichtigen, die dieser Methode die Extraktion von anthronpositivem Material vorwerfen, welches kein Glykogen ist. Deshalb prüften wir in einer besonderen Versuchsanordnung, ob die auf diese Art erhaltenen höheren Werte den wahren Glykogengehalt darstellen können bzw. in welchem Maße sie bei der photometrischen Bestimmung mit Anthron durch andere Substanzen verfälscht werden. Hierbei wurde neben dem aus den Blutplättchen gewonnenen Glykogen auch das zur Aufstellung der Eichkurve verwendete Glykogen der Fa. Merck, Darmstadt, kontrolliert.

Nach ROE und Mitarb. extrahiert KOH aus Gewebe auch Substanzen, die mit Alkohol fällbar und wasserlöslich sind, anthronpositiv reagieren, aber dialysierbar sind. Aus diesem Grunde führten wir mit Glykogen, welches aus KOH-Extrakten von Thrombozyten gewonnen wurde, Dialysen aus und versuchten, im Dialysat anthronpositives Material nachzuweisen.

Zur Dialyse wurde ein Cellophan-Dialysierschlauch verwendet. Das Verhältnis der Innen- zur Außenflüssigkeit betrug 1 : 50. Es wurde 2 Stunden bei Zimmertemperatur dialysiert, dann die Außenflüssigkeit auf 2 ml eingedampft und davon 0,4 ml auf anthronpositive Substanzen geprüft.

Zunächst dialysierten wir H_2O gegen H_2O, um zu prüfen, ob der Dialysierschlauch Substanzen abgibt, die anthronpositiv sind. Es wurde eine geringe Extinktion gemessen, die bei allen weiteren Versuchen Berücksichtigung fand.

Die Dialyse des aus den Thrombozyten nach der KOH-Extraktion gewonnenen Glykogen ergab 1,87% anthronpositive Substanzen. Eine ins Gewicht fallende Beeinflussung unserer Versuchs-

ergebnisse durch Erfassung der hier nachgewiesenen anthron-positiven, dialysierbaren Substanz kommt daher nicht in Betracht. Im Glykogen der Fa. Merck konnten wir dagegen keine dialysierbaren, anthronpositiven Substanzen nachweisen. Auf Grund der dargestellten Ergebnisse wurden alle weiteren Glykogenuntersuchungen nach der KOH-Methode von FONG und Mitarb. durchgeführt. Ein weiterer Vorteil dieser Ultramikromethode besteht darin, daß zur Glykogenbestimmung nur sehr geringe Mengen an Thrombozyten erforderlich sind. Man kommt bereits mit 1 - 3 mg trockener Plättchenmasse aus. So wurde es möglich, alle Bestimmungen dreifach auszuführen.

B. Der Glykogengehalt in Thrombozyten unter verschiedenen Bedingungen

I. Der Glykogengehalt von frisch isolierten Thrombozyten und nach Inkubation in physiologischer, phosphatgepufferter Kochsalzlösung.

In diesen Versuchen wurden die Thrombozyten stets zweimal in physiologischer Kochsalzlösung mit 1 mg Titriplex-III/ml gewaschen. Die anschließend vorgenommenen Glykogenbestimmungen ergaben bei 36 Schweinen einen mittleren Glykogengehalt von 2,38 $\pm$ 0,08%, bezogen auf das Plättchen-Trockengewicht. Der höchste gemessene Wert wurde mit 3,49% bestimmt, der kleinste betrug 1,26%. Von den 36 Werten lag der Glykogenbestand bei 15 Tieren zwischen 2,40% und 3,00%, bei 15 Schweinen zwischen 1,80% und 2,40%.

Der Glykogengehalt von 2,38% deckt sich mit dem im Abschnitt A mitgeteilten Vergleich von KOH- und TCE-Extraktion, bei dem wir mit der KOH-Methode bei 6 Schweinen einen Mittelwert von 2,37% fanden.

Jede Bestimmung wurde auch in allen folgenden Versuchen dreifach durchgeführt und der Durchschnitt errechnet. Da für diese Analysen die Thrombozyten in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurden, prüften wir zunächst in 2 Versuchen, ob sich ein zeitlicher Glykogenabfall in diesem Medium nachweisen läßt. Die gewaschenen Thrombozyten wurden bei 37° in physiologischer Kochsalzlösung 2, 4 und 6 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 wiedergegeben.

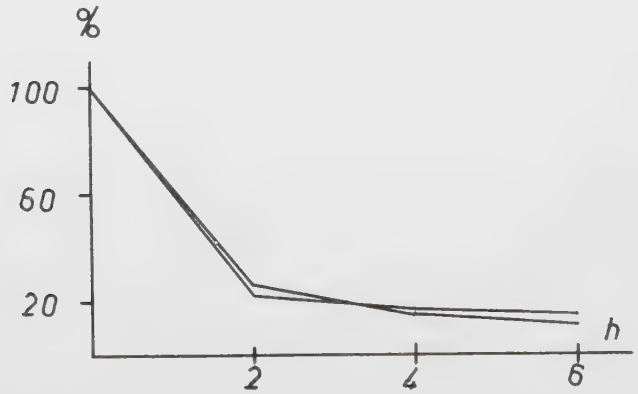

Abb.1: Verlauf des Glykogenabbaues in Thrombozyten bei Inkubation in PO_4-gepufferter NaCl-Lösung von pH 7,4 bei 37°. Angabe in Prozent des Ausgangswertes.

Es ist ersichtlich, daß bereits nach 2 Stunden der Glykogengehalt auf 24,5% abgefallen ist. Somit erfolgte der Glykogenabbau im wesentlichen bereits nach 2 Stunden, während in den folgenden 4 Stunden nur noch ein Abfall auf 13,6% gefunden wurde. Auch nach 10 Stunden war noch kein völliger Verlust des Glykogengehaltes festzustellen, er betrug noch etwa 12%.

II. Variation der Inkubationsmedien.

1. Physiologische Kochsalzlösung

a) mit Bicarbonatpuffer nach KREBS und HENSELEIT

Es erschien uns nicht ausgeschlossen, daß die Auswahl eines PO_4-freien Puffers die Ergebnisse von Abschnitt I beeinflussen kann. Wir wiederholten die dort wiedergegebenen Versuche an 3 Schweinen unter Anwendung des Bicarbonatpuffers von KREBS und HENSELEIT. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt.

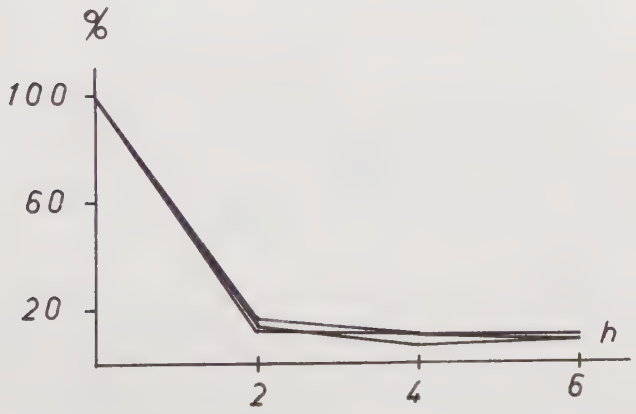

Abb.2: Verlauf des Glykogenabbaues in Thrombozyten bei Inkubation in bicarbonatgepufferter NaCl-Lösung von pH 7,4; 37°. Angabe in Prozent des Ausgangswertes.

Im Vergleich zu Abb.1 liegen die Glykogenwerte zu allen geprüften Zeitpunkten niedriger, jedoch kann auf Grund des geringen Unterschiedes keine sichere Aussage darüber gemacht werden, ob hier ein Unterschied vorliegt.

b) Pufferfreie Kochsalzlösung

Im Gegensatz zur gepufferten Kochsalzlösung wies die ungepufferte einen pH-Wert von 5,0 auf. In 4 Versuchen wurden die Blutplättchen 2, 4 und 6 Stunden in dieser Lösung als Suspensionsmedium inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb.3 aufgezeigt.

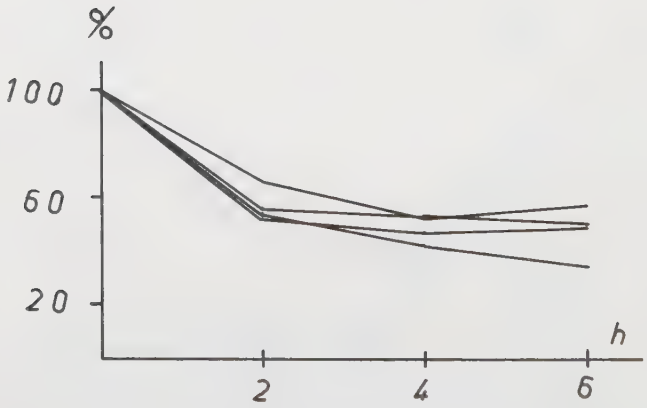

Abb.3: Verlauf des Glykogenabbaues in Thrombozyten bei Inkubation in ungepufferter NaCl-Lösung von pH 5,0; 37°. Angabe in Prozent des Ausgangswertes.

Der Glykogengehalt betrug nach 2 Stunden noch 57,2% und wurde nach 6 Stunden Inkubation mit 47,6% kaum weiter abgebaut. Dies läßt vermuten, daß - durch den niedrigen pH-Wert bedingt - beteiligte Enzymsysteme weitgehend inaktiviert sind.

c) Natriumcitrat als Antikoagulans

Es war weiterhin auszuschließen, daß der Glykogenabfall im Kochsalzmilieu maßgeblich durch den Gehalt von 1 mg Titriplex III/ml beeinflußt wird. Wir arbeiteten deshalb 3 Blutproben ohne jeden Titriplexgehalt auf. Als Antikoagulans wählten wir bei der Entblutung der Tiere Natriumcitrat (3,8%; Verdünnung mit Blut ca 1 : 4), weil sich durch phasenkontrastmikroskopische Kontrollen gezeigt hatte, daß neben EDTA die morphologische Struktur der Thrombozyten durch Citrat am besten konserviert wird. Bei der Inkubation der Thrombozyten wurde phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung ohne den von uns sonst geübten Zusatz von Titriplex verwendet. Da die Zellen vorher mit der gleichen Lösung gewaschen wurden, kann mit der weitgehenden Entfernung des Na-Citrates gerechnet werden. Es wurden 3 Versuche durchgeführt und die Ergebnisse in Abb.4 dargestellt.

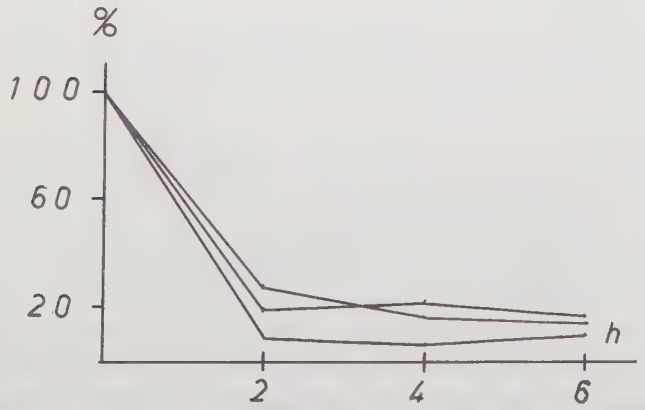

Abb.4: Verlauf des Glykogengehaltes in Thrombozyten bei Inkubation in gepufferter NaCl-Lösung von pH 7,4, die kein EDTA enthielt; 37°. Angabe in Prozent des Ausgangswertes.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den in Abb. 1 aufgetragenen Werten, so läßt sich eine gute Übereinstimmung beider Versuchsreihen erkennen. Auf Grund dessen nehmen wir an, daß Titriplex III keinen über den Einfluß von Na-Citrat hinausgehenden hemmenden oder fördernden Einfluß auf den Glykogenabbau ausübt.

Von den bisher dargestellten Resultaten wurden mit Ausnahme der unter b) beschriebenen Experimente die Durchschnittswerte für jede Versuchsanordnung errechnet. Die so gewonnenen Kurven wurden in Abb.5 zusammengefaßt.

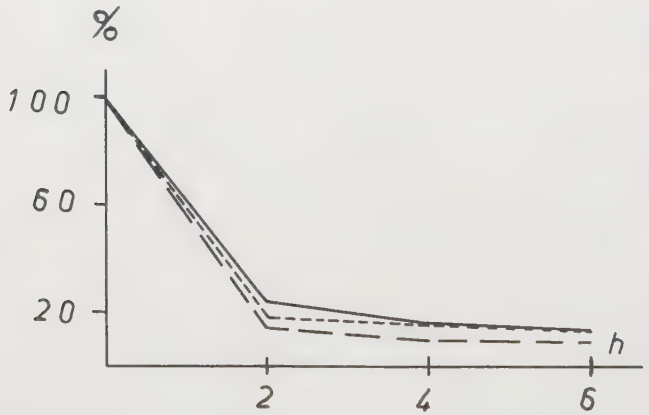

Abb.5: Verlauf des Glykogenabbaues in Thrombozyten bei Inkubation in gepufferter NaCl-Lösung von pH 7,4; 37°.
Mittelung der Werte von Abb.1 (_____)
Abb.2 (— — —), Abb.4 (---).
Angabe in Prozent des Ausgangswertes.

Es zeigt sich, daß die Schwankungen im Streuungsbereich liegen und demnach der Glykogenabbau unter den geschilderten Bedingungen mit gleicher Geschwindigkeit abläuft. Übereinstimmend läßt sich bei allen 3 Versuchsanordnungen eine schnelle initiale Phase des Glykogenabbaues feststellen, der sich eine 2. Phase anschließt, in der nur noch wenig Glykogen langsam abgebaut wird.

2. Plasma

Es erschien uns interessant zu prüfen, inwieweit der Glykogenbestand von Thrombozyten in ihrem physiologischen Milieu sich anders verhält als in Elektrolytlösungen. Die Thrombozyten wurden deshalb bei 37° 2, 4 und 6 Stunden in Plasma inkubiert. Der an Thrombozyten von 4 Schweinen untersuchte Glykogengehalt ist in Abb.6 aufgezeichnet.

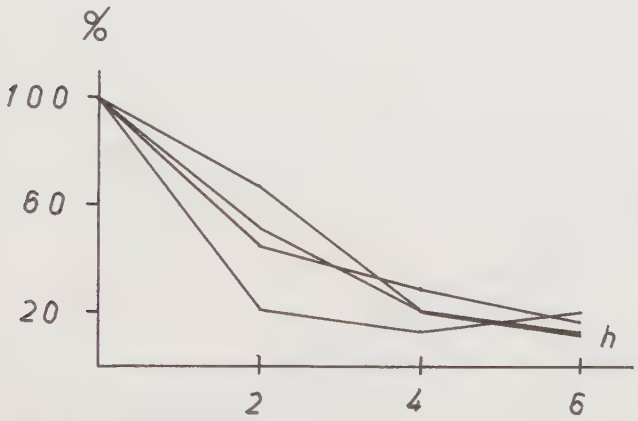

Abb.6: Verlauf des Glykogenabbaues in Thrombozyten bei Inkubation in Plasma; 37°. Angabe in Prozent des Ausgangswertes.

Es zeigt sich überraschenderweise nach 2 Stunden, daß durchschnittlich noch 46,8% des ursprünglichen Glykogengehaltes vorhanden war. Nach weiteren 2 Stunden war diese Menge wiederum auf die Hälfte abgefallen und betrug 21,4% des Ausgangswertes. Aus diesen Zahlen geht hervor, daß der Abbau etwa linear erfolgte.

Es erhebt sich nun die Frage, warum der Glykogenabbau im Plasmamilieu bedeutend langsamer vor sich geht. Als mögliche Ursache wäre der Glucosegehalt des Plasmas zu diskutieren. Wie aus dem nächsten Versuch zu ersehen ist, scheint tatsächlich die Glucose eine Rolle für die Aufrechterhaltung des Glykogengehaltes zu spielen.

3. Physiologische Kochsalzlösung mit 200 mg% Glucose

Die Thrombozyten wurden in einer physiologischen Kochsalzlösung mit 200 mg% Glucose 2, 4 und 6 Stunden bei 37° inkubiert. Um uns zu vergewissern, daß dem Phosphat auch bei Zusatz von Glucose keine Bedeutung beim Glykogenabbau zukommt, wurde die Kochsalzlösung in 3 Versuchen mit Phosphatpuffer gepuffert, in 3 weiteren Versuchen dagegen mit dem Bicarbonatpuffer nach KREBS und HENSELEIT. Die Ergebnisse sind in Abb.7 eingezeichnet.

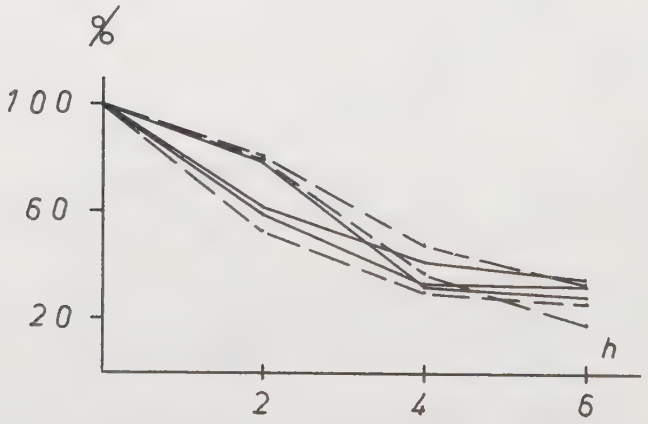

Abb.7: Verlauf des Glykogenabbaues in Thrombozyten bei Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung von pH 7,4 mit 200 mg/100 ml Glucose; 37°.

a) Bicarbonatpuffer ------
b) Phosphatpuffer _____

Angabe in Prozent des Ausgangswertes.

Gegenüber den glucosefreien Elektrolytlösungen fällt die wesentlich geringere Neigung der Kurve auf. Der Glykogenabbau erfolgt demnach langsamer. Nach 2 Stunden Inkubationszeit fanden sich noch 66,5% Glykogen, nach 6 Stunden waren noch 32,1% Glykogen vorhanden.

Dieser Glykogengehalt lag damit noch über dem 2-Stundenwert bei Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung, der nur 24,5% betrug. Bis zur 4. Stunde fiel dabei die Glykogenkonzentration fast linear ab. Wir sehen damit unsere Annahme als bestätigt an, nach der dem Glucosegehalt des umgebenden Milieus eine maßgebliche Rolle für die Aufrechterhaltung der Glykogenreserve zukommt.

II. Variation der Temperatur

Während die bisherigen Experimente bei 37° durchgeführt wurden, inkubierten wir in diesem Versuch bei 0° in physiologischer Kochsalzlösung oder in Plasma. Die Ergebnisse der 4 durchgeführten Versuche sind in Abb.8 dargestellt.

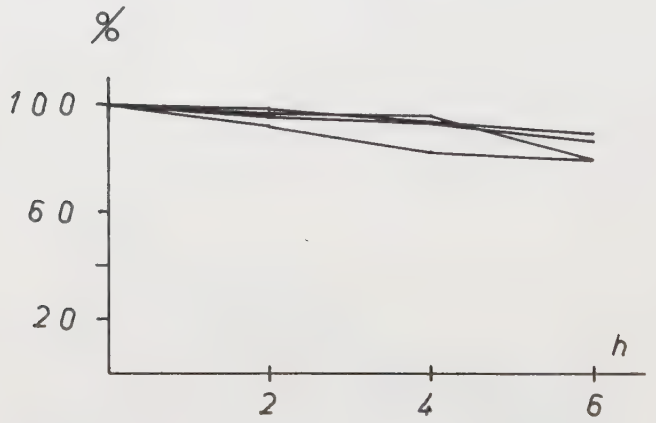

Abb.8: Verlauf des Glykogenabbaues in Thrombozyten bei Inkubation in Plasma oder phys. Kochsalzlösung von pH 7,4; 0° C. Angabe in Prozent des Ausgangswertes.

Der Glykogenabfall ist sehr gering, wie es bei der Herabsetzung der Stoffwechselaktivität zu erwarten war. Nach 2 Stunden Inkubationszeit wurden noch 96,4% Glykogen gefunden, die in 6 Stunden auf 83,8% abfielen. Es ergibt sich daraus, daß durch Herabsetzung der Temperatur der Glykogengehalt über mehrere Stunden auf seiner ursprünglichen Höhe gehalten werden kann.

III. Die Einwirkung von Natriumfluorid und 2,4-Dinitrophenol auf den Glykogenabbau.

Es lag nahe, den Glykogenabbau durch Stoffwechselinhibitoren zu verändern oder zu erschweren.
Die Thrombozyten wurden in 3 Versuchen in physiologischer Kochsalzlösung, die Natriumfluorid in der Konzentration von 10^{-3} M enthielt, 2, 4 und 6 Stunden bei 37° inkubiert.

Nach Blockierung der Glykolyse fanden wir den Glykogenabbau wesentlich verzögert. Während ohne Natriumfluorid der Glykogengehalt nach 2-stündiger Inkubation bei 24,5% lag, ist durch die Natriumfluorid-Intoxikation - wie sich aus Abb.9 ergibt - noch ein Glykogengehalt von 62,2% nachweisbar, der im 6-Stundenwert auf 32,4% abfällt.

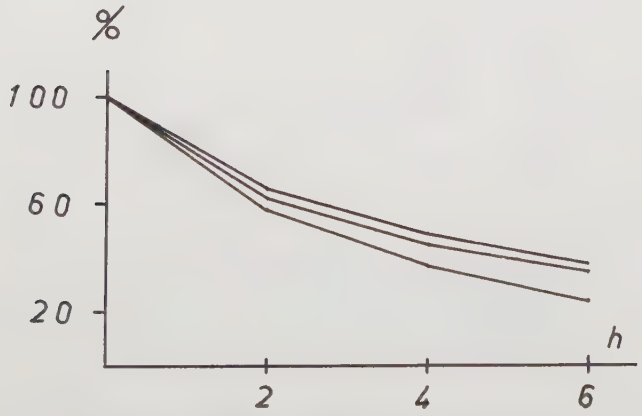

Abb.9: Verlauf des Glykogenabbaues in Thrombozyten bei Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung, die NaF (10^{-3} M) enthielt; 37°. Angabe in Prozent des Ausgangswertes.

Bei einer zweiten Versuchsreihe wurden die Thrombozyten in physiologischer Kochsalzlösung, die 2,4-Dinitrophenol (10^{-3} M) enthielt, suspendiert. Die Glykogenwerte dieser Thrombozyten lagen hierbei nach 2 Stunden im gleichen Bereich wie die Werte, die nach 2-stündiger Inkubation in physiologischer NaCl-Lösung gemessen wurden. Im Vergleich zu diesen Versuchen fiel jedoch die sehr schlechte Retraktionsfähigkeit der in 2,4-Dinitrophenol inkubierten Thrombozyten auf. Deshalb wählten wir für diese Versuche kürzere Inkubationszeiten von 30 min., 60 min., 90 min. und 120 min. Die Ergebnisse sind in Abb.10 aufgezeichnet.

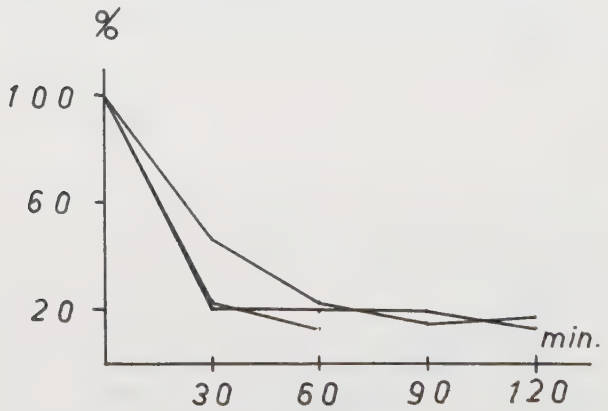

Abb.10: Verlauf des Glykogenabbaues in Thrombozyten bei Inkubation in physiol. NaCl-Lösung, die 2,4-Dinitrophenol (10^{-3} M) enthielt; 37°. Angabe in Prozent des Ausgangswertes.

Während nach 30 min. noch 32,9% Glykogen nachweisbar waren, betrug der Glykogengehalt nach 60 min. nur noch 19,6% des Ausgangswertes; er verringerte sich dann auf 17,1% nach 2 Stunden Inkubation.

Um auszuschließen, daß der schnelle Glykogenabfall durch Austritt von Glykogen über eine Permeabilitätsänderung der Plättchenmembran zustandekommt, inkubierten wir ca 0,5 g feuchte Thrombozytenmasse 1 Stunde bei 37^{0} in physiologischer Kochsalzlösung und parallel dazu 0,5 g in 2,4-Dinitrophenol (10^{-3} M). Nach der Inkubation wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand auf Glykogen nach der KOH-Methode untersucht. Von beiden Versuchsreihen wurden 3 Glykogenbestimmungen durchgeführt, die alle negativ ausfielen. Daraus schließen wir, daß es sich bei diesem Glykogenabfall nicht um eine Abgabe in das umgebende Milieu handeln kann.

C. Die Retraktion in Zusammenhang mit dem Glykogengehalt

Die inkubierten Thrombozyten wurden parallel zur Glykogenbestimmung auf ihr Retraktionsvermögen geprüft. Die gemittelten Retraktionswerte, die als Plasmarückstand in ml angegeben werden, sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Medium	n[1]	0^h ml[2]	2^h ml	4^h ml	6^h ml
Physiol.NaCl-Lösung 0^o	2	9,4	9,4	9,3	9,2
Physiol.NaCl-Lösung (Bicarbonat-Puffer) mit 200 mg% Glucose	3	8,9	8,4	8,5	7,9
Physiol.NaCl-Lösung (Phosphat-Puffer) mit 200 mg% Glucose	3	9,1	9,1	7,5	4,6
Physiol.NaCl-Lösung ohne Titriplex-III	3	9,0	9,4	6,9	5,8
Plasma	4	8,4	8,1	6,5	6,3
Physiol.NaCl-Lösung (Bicarbonat-Puffer)	3	8,9	8,1	6,0	5,2
Physiol.NaCl-Lösung (Phosphat-Puffer)	2	7,1	7,0	3,0	3,0
NaCl-Lösung pH 5,0	4	8,1	5,5	3,0	3,0
Physiol.NaCl-Lösung mit NaF (10^{-3} M)	3	9,3	6,4	5,3	4,7

Physiol.NaCl-Lösung mit 2,4-DNP (10^{-3} M)	n	30min.	60 min.	90 min.	120 min.	2^h
	3	9,3	3,9	3,0	2,0	2,0

Tab.2: Zusammenstellung der Retraktionsmessung an frisch isolierten Plättchen und nach Inkubation bei 37^o und 0^o in verschiedenen Medien.

1) n = Anzahl der untersuchten Tiere
2) Die Werte geben den nach MACFARLANE bestimmten Plasmarückstand nach Mittlung der Einzelmessungen in ml an.

Eine Übersicht über die parallel durchgeführten Retraktionsmessungen und Glykogenbestimmungen wird in Tabelle 3 gegeben. Dabei wurde die Retraktion nach der Größe des Plasmarückstandes in 3 Gruppen unterteilt: Ein Plasmarückstand über 8,4 ml bedeutet eine gute Retraktion, die Werte zwischen 8,4 ml und 6,5 ml werden als mäßige Retraktion eingestuft, während ein Plasmarückstand unter 6,5 ml eine schlechte oder fehlende Retraktion darstellt.

Medium	n [1]	0^h [2] % [3]	2^h [2] %	4^h [2] %	6^h [2] %
Physiol. NaCl-Lösung 0^o	2	+ 2,83	+ 2,66	+ 2,48	+ 2,35
Physiol. NaCl-Lösung (Bicarbonat-Puffer) mit 200 mg% Glucose	3	+ 2,30	+ 1,63	+ 0,89	- 0,61
Physiol. NaCl-Lösung (Phosphat-Puffer) mit 200 mg% Glucose	3	+ 2,72	+ 1,80	- 0,97	o 0,88
Physiol. NaCl-Lösung ohne Titriplex III	3	+ 2,55	+ 0,51	- 0,39	o 0,34
Plasma	4	+ 1,94	- 0,90	- 0,40	o 0,28
Physiol. NaCl-Lösung (Bicarbonat-Puffer)	3	+ 2,30	- 0,38	o 0,22	o 0,21
Physiol. NaCl-Lösung (Phosphat-Puffer)	2	- 1,61	- 0,41	o 0,27	o 0,22
NaCl-Lösung pH 5,0	4	- 2,21	o 1,29	o 1,10	o 1,06
Physiol. NaCl-Lösung mit NaF (10^{-3} M)	3	+ 2,33	o 1,46	o 1,16	o 0,77

Physiol.NaCl-Lösung mit 2,4-DNP(10^{-3}M)	n	0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
	3	+ 2,34	o 0,77	o 0,46	o 0,42	o 0,40

Tab.3: Übersicht über parallel durchgeführte Retraktionsmessungen und Glykogenbestimmungen in frisch isolierten Thrombozyten und nach Inkubation bei 37° und 0° unter verschiedenen Bedingungen.

1) n = Anzahl der untersuchten Tiere
2) = Ergebnisse der Retraktionsmessungen in 3 Gruppen eingeteilt: Gute Retraktion +
Mäßige " -
Schlechte " o
3) = Glykogengehalt in Prozent der getrockneten Plättchenmasse

Aus dieser Zusammenstellung geht klar hervor, daß die besten Retraktionsergebnisse von den Thrombozyten gemessen wurden, die bei 0^{o} in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert waren. Der sehr geringe Glykogenabbau fällt bei diesen Versuchen ebenfalls auf.

Alle weiteren Versuche wurden bei 37^{o} durchgeführt und hierbei zeigte sich, daß die Ergebnisse der Retraktion bei Zusatz von 200 mg% Glucose besser sind als bei den gleichen Versuchen ohne Glucose.

Ferner werden die Resultate bei Pufferung mit Bicarbonat bzw. mit Phosphat getrennt wiedergegeben, da der Bicarbonat-Puffer optimalere Elektrolytverhältnisse aufweist, so daß die besseren Retraktionsergebnisse der 4 und 6 Stundenwerte nicht überraschten.

Bei der Retraktion der im Plasma inkubierten Plättchen fällt im Vergleich zu den Versuchen in physiologischer Kochsalzlösung auf, daß nach 4 Stunden noch eine mäßige Retraktion meßbar war und der Glykogengehalt dabei noch doppelt so hoch analysiert wurde. Dies führen wir auf den Glucosegehalt des Plasma zurück, wie schon bei der Darstellung der Glykogenergebnisse ausgeführt wurde. Daneben spielen sicher auch andere im Plasma vorhandene Substanzen eine Rolle.

Während bei allen Versuchen EDTA als Antikoagulans verwendet wurde und damit auch im Plasma, in dem die Retraktion geprüft wurde, vorhanden war, ersetzten wir in einer Versuchsreihe das Titriplex-III durch Natriumcitrat und gaben auch dem Inkubationsmedium - in diesem Fall physiologische Kochsalzlösung - kein EDTA zu. Die Ergebnisse zeigen im Vergleich, daß besonders im 2-Stundenwert ohne EDTA-Zusatz trotz geringem Glykogengehalt noch eine gute Retraktion zustandekommt. Damit scheint das EDTA sich hemmend auf die Retraktion auszuwirken; wie dieser Wirkungsmechanismus zu erklären ist, bleibt offen.

Die Prüfung der Retraktion von Thrombozyten, die in Kochsalzlösung mit einem pH-Wert von 5,0 inkubiert waren, zeigte nach 2 Stunden zwar noch einen relativ hohen Glykogenwert, aber nur schlechte Retraktionsgrößen, was auf eine Hemmung des enzymatischen Geschehens zurückgeführt werden kann.

Am Ende der Tabelle sind Vergiftungsversuche mit Natriumfluorid und 2,4-Dinitrophenol aufgeführt.
Beim Natriumfluorid zeigte sich erwartungsgemäß trotz relativ hohem Glykogengehalt wegen Blockierung der Glykolyse eine schlechte Retraktion.
Die Versuche mit 2,4-Dinitrophenol als Zusatz der Kochsalzlösung zeigten bereits nach 30 min. Inkubationszeit nur noch eine schlechte Retraktion.

Es erschien nun interessant, an den unter gleichen Bedingungen (EDTA-Zusatz und Phosphat-Pufferung) durchgeführten Versuchen zu prüfen, ob sich ein Zusammenhang zwischen Glykogengehalt und Retraktionsgröße aufzeigen läßt. Eine Berücksichtigung der Inkubationszeit entfällt bei dieser Betrachtungsweise. Die Beziehung des Glykogengehaltes zur Retraktionsgröße ist im Korrelationsbild (Abb.11) demonstriert. Es sind nur die Ergebnisse der guten und mäßigen Retraktion erfaßt, das bedeutet, bis zu einem Plasmarückstand von 6,5 ml. Auf der Ordinate wurde der Plasmarückstand in ml aufgetragen; die Abszisse gibt den absoluten Glykogengehalt an. Der O-Punkt ergab sich aus der Mittelung sämtlicher x- und y-Werte. Alle Werte oberhalb der Abszisse bezeichnen eine gute Retraktion; alle Werte, die unterhalb der Abszisse liegen, stellen eine schlechte Retraktion dar. Ebenso wurde der Glykogengehalt eingestuft, indem alle Werte, die rechts von der Ordinate liegen, einen hohen Glykogengehalt bedeuten, links von der Ordinate stellen sie einen niedrigen Glykogengehalt dar.

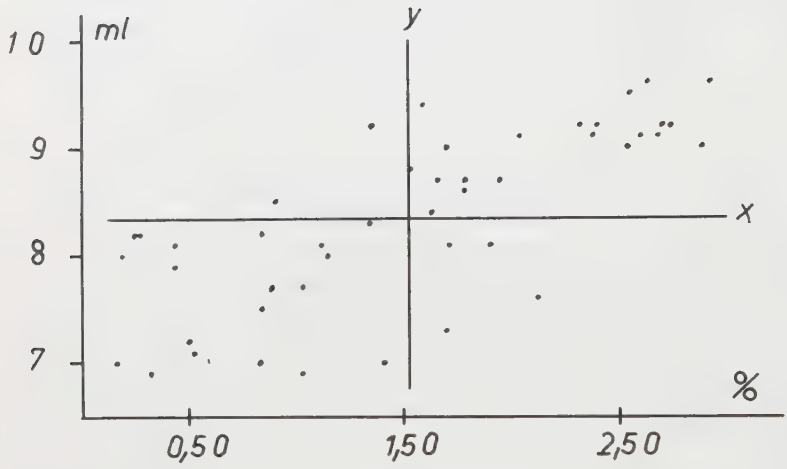

Abb.11: Korrelationsbild
Glykogengehalt (%) in Abhängigkeit von
der Retraktion (ml Plasmarückstand)

Da sich nahezu alle Punkte nur auf 2 der insgesamt 4 möglichen Felder verteilen, ergibt schon die Betrachtung dieser graphischen Darstellung, daß in fast allen Fällen ein hoher Glykogengehalt mit einer guten Retraktion, ein niedriger Glykogenwert dagegen mit einer schlechten Retraktion vergesellschaftet war.

Eine Berücksichtigung der Resultate, bei denen ein Plasmarückstand unter 6,5 ml gemessen wurde, ändert an dem Verteilungsschwerpunkt grundsätzlich nichts, da diese Werte alle in das linke untere Feld einzuzeichnen sind. Wir verzichteten dennoch bewußt darauf, diese Ergebnisse einzubeziehen, weil ein Plasmarückstand unter 6,5 ml nicht mehr als Retraktion im Sinne einer ablaufenden Funktion angesehen werden kann, und es darauf ankam, eine Beziehung zwischen dem Glykogengehalt und einem funktionellen Geschehen - der Retraktion - zu untersuchen.

Ein Maß für diese Abhängigkeit ist durch den Korrelations-Koeffizienten gegeben. Er wurde nach folgender Formel berechnet (DOERFFEL):

$$\mathcal{C} = \frac{N\Sigma x_i y_i - \Sigma x_i y_i}{\sqrt{\left[N\Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2\right] \left[N\Sigma y_i^2 - (\Sigma y_i)^2\right]}}$$

Mit $\mathcal{C}$ = + 0,74 zeigte sich eine hohe mathematische Signifikanz. Die Prüfung der Abweichung des Korrelationskoeffizienten von 0 ergab $p \ll 0{,}001$. Das positive Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten gibt an, daß eine gleichsinnige Abhängigkeit besteht, indem die Höhe des Glykogengehaltes dem Ausmaß der Retraktion parallel läuft.

D i s k u s s i o n

Seit kurzem werden in der Klinik Transfusionen von Thrombozyten durchgeführt, vor allem in Fällen von Hämorrhagien bei thrombozytopenischen Patienten.

So fordern BALDINI u. Mitarbeiter bei allen Thrombozytopenien mit einer Blutungszeit von über 30 Min. neben lokal blutstillenden Maßnahmen zusätzlich eine Blutplättchen-Infusion, die gegebenenfalls in kurzen Intervallen zu wiederholen ist.

Die Überlebenszeit transfundierter Thrombozyten im Empfängerorganismus erwies sich als umgekehrt proportional der zwischen Blutgewinnung und Transfusion verflossenen Zeit (JACKSON u. KREVANS). Nach RACUGGLIA u. BETHELL rufen nur Blutplättchen, die weniger als 24 Std. bei 6° gelagert worden sind, einen brauchbaren hämostatischen Effekt hervor. BALDINI u. Mitarbeiter verlangen dagegen auf Grund ihrer Untersuchungen, daß die Infusion innerhalb der ersten drei Stunden nach Gewinnung des Spenderblutes erfolgt.

Extravasierte Thrombozyten befinden sich demnach in einem labilen Zustand, dessen Erhaltung für den Erfolg der Transfusion ausschlaggebend ist. Bisher ist nicht bekannt, worin dieser Zustand im einzelnen besteht und welche Bedingungen erfüllt sein müssen, um ihn zu erhalten. Inzwischen ist man über stationäre Konzentrationen einer Reihe von Substraten in Blutplättchen durch Untersuchungen der letzten Jahre orientiert. Wenig ist aber nur über die Umsatzgrößen dieser Stoffe bekanntgeworden. Den von WALLER, LÖHR, GRIGNANI u. GROSS vorgelegten Daten über die Aktivitäten verschiedener Fermente in menschlichen Thrombozyten ist zu entnehmen, daß neben einem hohen glykolytischen Umsatz ein nur geringes Ausmaß der Weiterverarbeitung von Milchsäure über den Zitronensäurezyklus sowie ein nur geringfügiger oxydativer Abbau von Glucose gegenübersteht. Systematische Untersuchungen zur Beeinflußbarkeit dieser Verhältnisse durch

in-vitro-Bedingungen und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Plättchenkonservierung, deren Gelingen erst die breitere Anwendung von Thrombozyten-Infusionen ermöglichen würde, fehlen weitgehend. Hier liegt ein Ansatzpunkt der vorliegenden Arbeit.

Über das Verhalten von Glykogen in inkubierten Thrombozyten in Abhängigkeit von der Zeit haben unseres Wissens nur WOODSIDE u. KOCHOLATY Angaben vorgelegt. Diese Werte beziehen sich auf Lagerung menschlicher Plättchen bei 0°.

Es fanden sich nach eintägiger Aufbewahrung von Vollblut weniger als die Hälfte der durchschnittlichen Glykogenmenge frisch isolierter Thrombozyten. Wurden die Zellen dieser Proben isoliert und weitere 16 - 24 Stunden in NaCl-Lösung suspendiert, so fiel der Glykogengehalt nur noch etwa um ein Zehntel ab. Daraus wurde geschlossen, daß in Vollblut der Kohlenhydratstoffwechsel von Thrombozyten schneller abläuft als in Kochsalzlösung.

Wenn man eine gleichmäßige Abbaugeschwindigkeit des Glykogens in Thrombozyten bei 0° annimmt, so sind die von WOODSIDE u. KOCHOLATY gefundenen Werte gut mit den unsrigen übereinstimmend. Der von diesen Autoren gemessene langsamere Zerfall von Glykogen bei anschließender zusätzlicher Inkubation der über 24 Stunden geprüften Probe in physiologischer Kochsalzlösung könnte eine Folge des vermutlich schwach sauren pH-Wertes des Mediums sein, da keine Pufferung angegeben wurde. Nach unseren Beobachtungen genügt aber diese geringe pH-Verschiebung bereits zur Hemmung des Glykogenumsatzes. Wir konnten keinen Anhaltspunkt für eine Beeinflussung des Thrombozyten-Glykogens durch andere Blutbestandteile finden, wie sie von WOODSIDE u. KOCHOLATY vermutet wird.

In Leukozyten fand WAGNER nach 24-stündiger Lagerung in Vollblut bei 4° nur noch 7% des ursprünglichen Glykogenbestandes vor. In isolierten Leukozyten soll die Abbaurate noch erheblich höher sein.

ESMANN stellte nach einer 30-minütigen Sedimentationsperiode von frischem Plasma 8,7% mehr Glykogen in Leukozyten fest, wenn dieser Vorgang bei Zimmertemperatur statt im Eisbad ablief. Dementsprechend fand der gleiche Autor in unveröffent-

lichten Versuchen bei 37° eine Synthese von Glykogen. Dauerte die Absetzung im Eisbad eine Stunde, dann wiesen die Leukozyten 11,1% weniger Glykogen auf als die Kontrollen.

In keinem einzigen Fall, auch nicht in den Versuchen, in denen sich Glucose in der Suspensionsflüssigkeit befand, haben wir einen Anstieg der Glykogenwerte bei Inkubation beobachtet. Eine Glykogensynthese, die über die Nachlieferung etwa abgebauter Glykogenmengen hinausging, fand also nicht statt. Die Ursache der unter Glucose-Zusatz bzw. im Plasmamilieu beobachteten langsameren Abbauraten für Glykogen ist unklar.

Es sind verschiedene Hypothesen möglich. Eine davon wäre, daß bei Substratnachlieferung eine beschränkte Glykogensynthese auch in isolierten Thrombozyten abläuft. Dies würde aber eine Verwertung von Glucose über den Aufbau von Glykogen voraussetzen, was unseres Wissens für Blutplättchen experimentell noch nicht geprüft wurde. Unsere dargestellten Befunde lassen keinerlei Aussage darüber zu, ob die erwähnte Hypothese oder welche andere Erklärung zutrifft.

Überblickt man das Verhalten des Glykogens isolierter Thrombozyten, wie es im Ergebnisteil dargestellt ist, so zeigte sich in den meisten Fällen ein initial schneller Abbau innerhalb der ersten zwei Stunden, dem eine Phase mit langsamer Zerfallsgeschwindigkeit folgte. Ausnahme hiervon bildeten lediglich die Plättchen, die bei 0° oder in Plasma inkubiert worden waren oder denen Glucose zugesetzt war. Dem Phosphatgehalt oder einem Zusatz von EDTA im Inkubationsmedium kommt in Bezug auf den Glykogenabbau keine Bedeutung zu.

Weiterhin bezweckt diese Untersuchung, wie schon anfangs erwähnt, einen möglichen Zusammenhang zwischen einem in hoher Konzentration vorliegenden Metaboliten, dem Glykogen, und einer funktionellen Leistung, der Retraktion, aufzusuchen. Hinweise dafür, daß Glucoseabbau und die Retraktion des Gerinnsels eng miteinander gekoppelt sind, liegen in der Literatur seit kurzem in überzeugender Weise vor.

Über die Beeinflußbarkeit der Retraktion durch äußere Bedingungen ist seit Jahren ein umfangreiches experimentelles Material zusammengetragen worden. Man ist gut darüber orientiert, wie lange eine Retraktion in gelagerten Thrombozyten,

auch in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur, nachgewiesen werden kann, und welche Effekte verschiedenes Oberflächenmaterial der Reaktionsgefäße, Röntgenbestrahlung der Thrombozyten, Einfrieren und Auftauen der Plättchensuspension, Konzentrationsänderungen der verschiedenen Komponenten des Gerinnungssystems u.a.m. auf den Retraktionsvorgang ausüben. Das einfachste System, in dem er ausgelöst werden kann, verlangt neben intakten Thrombozyten nach heutigen Kenntnissen Fibrinogen, Thrombin, Ca^{++}, Glucose, neutralen pH-Wert, ein Milieu von adäquater Ionenstärke und vielleicht gewisse Plasmafaktoren (CONLEY).

LÜSCHER fand, daß der Retraktionsvorgang mit Milchsäurebildung einhergeht und nicht mehr auslösbar ist, wenn durch Zerstörung der Thrombozyten die Milchsäurebildung aufhört. 1958 wurde von BORN erstmalig ein Abfall der ATP-Konzentrationen in Thrombozyten während des Gerinnungsvorganges beschrieben. Daß bereits geringfügige Veränderungen im ATP-Gehalt die Retraktion stören, haben GROSS u. Mitarbeiter und WALLER u. Mitarbeiter 1958 berichtet. Im Hemmversuch mit NaF, Monojodessigsäure, Malonat oder NaCN war die Retraktion schwer beeinträchtigt bzw. aufgehoben. BETTEX-GALLAND und LÜSCHER fanden 1960, daß eine direkte Beziehung zwischen Atmung der Thrombozyten und der Gerinnselretraktion nicht besteht. Dagegen zeigte sich parallel zur Retraktion kurzanhaltend eine bemerkenswerte Steigerung der glykolytischen Aktivität, gemessen an Milchsäurebildung und Glucoseverbrauch. Anschließend erfolgte ein kompletter Zusammenbruch der Glykolyse. Der ATP-Spiegel in den Plättchen zeigte gleichlaufend zunächst einen Anstieg, darauf einen raschen Abfall. Die Retraktionsaktivität der Zellen war unmittelbar von der Höhe ihres ATP-Bestandes abhängig. Der Verbrauch von ATP wird mit der Kontraktion eines dem Aktomyosin ähnlichen Proteins, welches die gleichen Autoren aus Thrombozyten isoliert haben, erklärt.

Die Ergebnisse von ZUCKER u. BORRELLI decken sich weitgehend mit den bisher dargestellten. Während der viskösen Metamorphose und der Retraktion fand sich ein Absinken des ATP-Gehaltes um etwa 50% innerhalb 10 Min. bei gleichzeitigem Anstieg der Orthophosphatwerte.

1961 haben LÖHR, WALLER u. GROSS ihre bis dahin erzielten Resultate über den Plättchenstoffwechsel und seine Beziehung zur Retraktion des Blutgerinnsels zusammengefaßt. Auch sie fanden, daß der ATP-Gehalt der Thrombozyten während der viskösen Metamorphose nach einer Exponentialgleichung um etwa die Hälfte abfällt, dann im weiteren Verlauf der Retraktion nur noch wenig abnimmt. Ebenso stützten die Ergebnisse, welche durch Zusatz von Giften der Glykolyse, des Zitronensäurezyklus und der Atemkettenphosphorylierung erhalten wurden, ebenso wie die Befunde, welche an Plättchen von Patienten mit Glanzmann-Naegelischer Thromasthenie erhoben wurden, die Ansicht der Verfasser, nach der eine enge Beziehung zwischen dem Energiestoffwechsel der Thrombozyten und der Retraktion des Blutgerinnsels besteht.

Aus diesen Beobachtungen LÜSCHERs und den Befunden von BORN, von ZUCKER u. BORRELLI und des Arbeitskreises um GROSS, WALLER u. LÖHR geht mit großer Wahrscheinlichkeit hervor, daß für die Retraktion weitgehend glykolytische Vorgänge in den Thrombozyten die energieliefernden Prozesse stellen.

Daß auch noch andere Vorgänge mit hineinspielen, erhellt daraus, daß trotz der weit überwiegenden glykolytischen Aktivität in Thrombozyten auch mit Hemmern des Zitronensäurezyklus und mit Atmungsgiften eine Aufhebung der Retraktion erreicht werden kann, obwohl nach BETTEX-GALLAND u. LÜSCHER bei Zugabe von Thrombin die Sauerstoffaufnahme der Plättchen sicher nicht gefördert, eher sogar gehemmt wird.

Bei diesen Untersuchungen ist der inzwischen in Thrombozyten nachgewiesene Glykogen-Gehalt unberücksichtigt geblieben. Er wurde quantitativ bei Mensch (WOODSIDE u. KOCHOLATY; LÖHR, WALLER u. GROSS), beim Rind (WOODSIDE u. KOCHOLATY) und beim Schwein (diese Arbeit) bestimmt und ist mit einem Anteil von 2,26 bis 2,42% am Trockengewicht erstaunlich hoch. Tab.4 gibt die bisher gemessenen Glykogenwerte von Blutplättchen im Vergleich zu den in anderen Organen ermittelten wieder.

Species	n	Zellart	Glykogen % des Trockengew.	Extraktionsmittel	Literatur
Mensch	6	Thrombozyten	1,16 ± 0,17	TCE	WOODSIDE u. KOCHOLATY 1960
Mensch	6	Thrombozyten	2,34 ± 0,17	KOH	
Rind	6	Thrombozyten	1,16 ± 0,32	TCE	
Rind	6	Thrombozyten	2,26 ± 0,36	KOH	
Mensch	6	Thrombozyten	2,42 *2	?	LÖHR, WALLER u. GROSS 1961
Schwein	30	Thrombozyten	2,10 ± 0,11	TCE	diese Arbeit
Schwein	36	Thrombozyten	2,38 ± 0,08	KOH	diese Arbeit
Mensch	10	Leukozyten	2,12 *3	KOH	LEIKIN 1961
Mensch	20	Lymphozyten	4,73 *3	KOH	
Mensch	25	Leukozyten	6,17 *3	KOH	ESMANN 1961
Mensch		Skelettmuskel	2,0 - 4,0	?	LOHMANN u. OHLMEYER
Ratte		Skelettmuskel	1,8	KOH	BLOOM u. KNOWLTON 1953
Ratte		Herzmuskel	1,10	KOH	MERRICK u. MEYER 1954
Mensch		Leber	4 - 28	KOH	CREMER u. FÜHNER

*1 ± mittlerer Fehler des Mittelwertes

*2 umgerechnet auf Trockengewicht nach Angaben von WOODSIDE u. KOCHOLATY

*3 umgerechnet auf Trockengewicht nach Angaben von BIRD, CLEMENTS u. BECKER und von WILLSTÄTTER u. ROHDEWALD (b).

Tab.4: Übersicht über die bisher mitgeteilten quantitativen Glykogenanalysen in Thrombozyten im Vergleich zum Glykogengehalt in anderen Zellarten.

Soweit mitgeteilt, wurde die Art der Gewebsextraktion mit angegeben. Da sich einige Originalangaben nicht auf das Trockengewicht der betreffenden Zellart bezogen, mußten diese Werte umgerechnet werden, wobei der Wassergehalt der verschiedenen Organe der Literatur entnommen wurde. Die Ergebnisse stellen sicher, daß entgegen früher geäußerter Ansicht (WAGNER; ZINGONI) Glykogen ein Bestandteil der Blutplättchen darstellt. Auffällig ist die nahezu vollständige Übereinstimmung für die drei geprüften Species, obwohl drei voneinander unabhängige Arbeitskreise an den Analysen beteiligt waren. Aus der Tabelle geht hervor, daß der Glykogenbestand in Thrombozyten, bezogen auf das Trockengewicht, dem des Skelettmuskels entspricht und nur von Lebergewebe übertroffen wird. Beide Organsysteme stellen bekanntlich außerhalb des Blutes die glykogenreichsten Zellen des Säugetierorganismus.

Nur in Leukozyten, und nach Ergebnissen von LEUKIN besonders in Lymphozyten, finden sich ähnlich hohe Werte für Glykogen wie in den Blutplättchen. Es ist in der Literatur vereinzelt versucht worden, dieses Reservoir gewissen Funktionen des Leukozyten als Energiequelle zuzuordnen.
HOPPE-SEYLER (1910) nahm eine Beziehung zwischen Glykogengehalt und den amöboiden Bewegungen von Leukozyten an.
Auf Grund von Beobachtungen mit dem Phasenkontrastmikroskop und anschließenden Glykogenanalysen äußert sich PAVLOV in ähnlicher Weise, bezieht dabei aber noch die Phagozytose der weißen Zellen mit ein. In Übereinstimmung damit berichteten KARNOVSKY u. SBARRA kürzlich, daß dieser Vorgang weitgehend von der Glykolyse abhängig sei.

Einen hohen Glykogengehalt findet man in den Zellarten, deren Aufgabe die Schaffung eines Energiedepots ist (Leber) oder dort, wo der Nachschub von energieliefernder Glucose zu Zeiten höchster funktioneller Aktivität nicht in ausreichendem Maße gesichert ist wie in Muskelgewebe. Für Thrombozyten ist zwar nach Berechnungen von BORN u. ESNOUF ein höherer Energievorrat als dem Bedarf bei der Retraktion entspricht allein durch den hohen ATP-Gehalt gegeben, aber es ist bis-

her durch nichts bewiesen, daß nicht noch andere endergonische Reaktionen im Zusammenhang mit der Gerinnung oder sonstigen, dazu parallel oder zu anderen Zeiten ablaufenden Funktionen in Thrombozyten ablaufen. Immerhin erscheint es unbefriedigend, dem auffallend hohen Glykogengehalt in den Plättchen keine funktionelle Bedeutung beizumessen.

Über den Sinn dieses Glykogendepots in den Thrombozyten sind bisher noch keine Vermutungen geäußert worden. Es lag nahe, zunächst parallel zur Ausführung der Glykogen-Bestimmungen die Funktion der Plättchen gleichzeitig zu prüfen, die mit Wahrscheinlichkeit Energie beansprucht.

Wie schon erwähnt, waren in unseren Experimenten in den meisten Fällen hoher Glykogen-Bestand und gutes Retraktionsvermögen einerseits und niedriger Glykogengehalt und mangelhafte oder fehlende Retraktilität miteinander vergesellschaftet. Ein Maß für die Verknüpfung beider Wertereihen bietet der zu + 0,74 errechnete Korrelationskoeffizient. Man kann aus diesem Ergebnis den Schluß ziehen, daß dem Glykogenbestand der Thrombozyten für den Retraktionsvorgang eine Bedeutung zukommt. Welcher Art sie ist, ob es sich um eine zusätzliche Energiequelle für den Vorgang selbst handelt, oder ob Glykogen eine Rolle bei der Ingangsetzung des Prozesses spielt, kann zunächst auf Grund des aufgezeigten mathematisch-statistischen Zusammenhanges nur vermutet werden und bedarf weiterer experimenteller Klärung. Nach den bisher vom Stoffwechsel der Thrombozyten bekannten Daten und den heute gültigen Anschauungen erscheint auch der funktionelle Zusammenhang beider Größen nicht ausgeschlossen.

Zusammenfassung

In frisch gewonnenen Schweinethrombozyten wurde der Glykogengehalt nach KOH- bzw. TCE-Extraktion quantitativ analysiert und miteinander verglichen. Bei der Glykogenbestimmung von 36 Schweinen fand sich nach KOH-Extraktion ein mittlerer Glykogengehalt von 2,38 $\pm$ 0,08%, bezogen auf das Gewicht der getrockneten Plättchenmasse; dagegen ergab die Untersuchung von 30 weiteren Schweinen nur einen durchschnittlichen Glykogengehalt von 2,10 $\pm$ 0,11%, wenn die Blutplättchen mit Trichloressigsäure extrahiert worden waren.

Das Verhalten des Glykogengehaltes von Schweinethrombozyten wurde in vitro unter verschiedenen Bedingungen über eine mehrstündige Inkubationsperiode hinweg untersucht. Die bei 0° in 0,9% NaCl-Lösung oder in Plasma suspendierten Thrombozyten wiesen noch nach 6 Stunden 87,1% des ursprünglichen Glykogengehaltes auf; bei 37° war schon nach 2 Stunden ein steiler Abfall um 75,5% erfolgt. Glucosezusatz verlangsamte den Abbau. Während NaF (10^{-3} M) den Glykogenabbau hemmte, blieb 10^{-3}M 2,4-DNP ohne Effekt auf die Zerfallsgeschwindigkeit von Glykogen gegenüber unvergifteten Kontrollen.

Parallel zur Glykogenanalyse wurde von den unter gleichen Bedingungen gehaltenen Thrombozyten das Retraktionsvermögen bestimmt. Am längsten blieb die Retraktion in den bei 0° inkubierten Thrombozyten voll erhalten. Es zeigte sich eine hohe statistische Wahrscheinlichkeit ($p \leqslant 0{,}001$) für eine Korrelation zwischen Glykogenbestand in den Thrombozyten und der Retraktionsfähigkeit des Gerinnsels. Der Korrelationskoeffizient betrug + 0,74.

L i t e r a t u r n a c h w e i s

1. ALEXANDER, B: in: Blood Cells and Plasma Proteins: their state in nature; herausgegeben von J.L. Tullis, Academic Press, New York, 1953

2. BALDINI, M.; N. COSTEA u. W. DAMASHEK: Blood 16, 1669 (1960)

3. BESTETTI, A. und P.F. CROSTI: Atti Soc. lomb. Scien. Med. Biolog. 10, 284 (1955)

4. BETTEX-GALLAND, M. u. E.F. LÜSCHER: Thromb. Diath. haem. 4, 178 (1960)

5. BIRD, R.M.; J.A. CLEMENTS u. L.M. BECKER: Cancer 4, 1009 (1951)

6. BLOOM, W.L. u. G.C. KNOWLTON: Amer. J. Physiol. 173, 545 (1953)

7. BLOOM, W.L.; G.T.LEWIS; M.Z.SCHUMPERT u.T.SHEN: J. biol. Chem. 188, 631 (1951)

8. BORN, G.V.R: a) J. Physiology 133, 618 (1956)
b) Biochem. J. 68, 695 (1958)

BORN, G.V.R. u. M.P. ESNOUF: in "Blood platelets", Little, Brown u. Co., Boston, 1961

9. CAMPBELL, E.W., W.J.SMELL u.W.DAMASHEK: J. Lab.clin.Med. 47, 835 (1956)

10. CONLEY, C.L.: in "Blood platelets", herausgegeben von S.A. Johnson u.a., Little, Brown u. Co., Boston, 1961

11. CREMER, H.D. und J. FÜHR: in: Hoppe-Seyler / Thierfelder Handbuch der physiologisch-pathologisch-chemischen Analyse, 10. Auflage; Springer, Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1953

12. DOERFFEL, K.: Z. analyt. Chem. 185, 1 (1962)

13. DRATZ, A.F.; J.A.RUSSEL u. B.M.COVEY: Fed. Proc. 15, 52 (1956)

14. ESMANN, V.: Scand. J.clin.lab.Inv. 13, 134 (1961)

15. FONG, J., F.L.SCHÄFFER u. P.L.KIRK: Arch.Biochem.Biophys.45, 319 (1953)

16. GIBB, R.P. und R.E. STOWELL: Blood 4, 569 (1949)

17. GROSS, R., G.W. LÖHR, H.D. WALLER: 4th Internat. Congr. Biochem. Wien 1958, Vol. X, 92

18. HECKNER, F.: Acta haematol. (Basel) 16, 1 (1956)

19. HOPPE-SEYLER, G.: in: Lehrbuch der physiologischen Chemie von Olof Hammarsten, 1910

20. JACKSON, D.P., u. J.R. KREVANS: Bull Johns Hopkins Hosp.107, 349 (1960)

21. KARNOVSKY, M.L. u. A.J. SBARRA: Fed. Proc. 18, 257 (1959)

22. KEMP, A. u.A.J.M.KITS van HEIJNINGEN: Biochem. J. 56, 646 (1954)

23. KORITZ, S.B. u. A. MUNCK: Biochim. Biophys. Acta 39, 543 (1960)

24. LEIKIN, S.L.: Proc.Soc.exp.Biol.Med. 106, 286 (1961)

25. LÖHR, G.W., H.D.WALLER u.R.GROSS: Dtsch.med.Wschr. 86, 897 (1961)

26. LOHMANN, K. u. P. OHLMEYER: in: Physiologische Chemie, herausgegeben von B. Flaschenträger u. E. Lehnartz; Springer, Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1956

27. LOURAU, M. u. F. MEYER: J. Physiologie 50, 5 (1958)

28. LÜSCHER, E.F.: Experientia 12, 294 (1956)

29. MACFARLANE, R.G.: Lancet 1939/I, 1199

30. MAUPIN, B.: Les Plaquettes Sanguines de l'Homme. Masson u. Co., Paris, 1954

31. MERRICK, A.W. u. D.K. MEYER: Amer. J. Physiol. 177, 441 (1954)

32. PAVLOV, B.A.: Therapeut. Arch. (Moskau) 1960, 44

33. RACCUGLIA, G. u. F.H. BETHELL: Amer.J.clin.Path. 34, 495 (1960)

34. ROE, J.H., J.M.BAILEY, R.R.GRAY u.J.N.ROBINSON: J. biol. Chem. 236, 1244 (1961)

35. RUSSEL, J.A. u. W.L. BLOOM: Amer. J. Physiol. 183, 345 (1955)

36. STETTEN, M.R. H.M.KATZEN u.D.STETTEN: J. biol. Chem. 232, 475 (1958)

37. STETTEN, M.R. u. D. STETTEN jr.: J. biol. Chem. 207, 331 (1954)

38. STORTI, E., S.PERUGINI u.M.SOLDATI: Acta haematol. (Basel) 10, 144 (1953)

39. van der VIES, J.: Biochem. J. 57, 410 (1954)

40. WAGNER, R. Arch. biochem. 11, 249 (1946)

41. WALLER, H.D., G.W.LÖHR, F.GRIGNANI u. R.GROSS: Thromb. Diath. haem. 3, 520 (1959)

42. WALLER, H.D., G.W.LÖHR, O.KARGES u. R.GROSS: Transact. 7th int. Congr. Haematology Rome 1958

43. WILLSTÄTTER, R. u. M. ROHDEWALD: a) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 225, 103 (1934);
b) ebenda, 247, 115 (1937)

44. WISLOCKI, G.B., J.J. RHEINGOLD u. E.W. DEMPSEY: Blood 4, 562 (1949)

45. WOODSIDE, E.E. u. W. KOCHOLATY Blood 16, 1173 (1960)

46. ZINGONI, U.: Arch. fisiol. 50, 359 (1952)

47. ZUCKER, M.B. u. J. BORRELLI: in "Blood platelets", herausgegeben von S.A. Johnson u.a., Little, Brown u. Co., Boston, 1961

S c h l u ß w o r t

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. O. Eichler für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und die freundliche Unterstützung, die er meiner Arbeit gewährte.

Fräulein Dr. Ellen Weber danke ich herzlich für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche und bei der Bearbeitung des Themas.

L e b e n s l a u f

Am 22. Februar 1937 wurde ich, Wolfgang Littmann, als erster Sohn des Dental-Kaufmanns Herbert Littmann und seiner Ehefrau Käthe geb. Lemke in Leipzig geboren.

Nach 5-jährigem Besuch der Grundschule fand ich im März 1949 Aufnahme im Thomanerchor zu Leipzig und besuchte von da an die Thomas-Schule als Alumne bis zum Abitur im Jahr 1955.

Im September 1955 begann ich mit dem Studium der Veterinär-Medizin an der Universität Leipzig. Nach 6 Semestern verließ ich Leipzig und setzte mein Studium mit 3 Semestern an der Justus-Liebig-Universität in Gießen / Lahn fort. Dort bestand ich im Juli 1960 das Staatsexamen.

Nach 6-monatiger Pflichtassistenz in Weinheim/Bergstraße erhielt ich im März 1961 die Approbation als Tierarzt.

Seitdem arbeitete ich am Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg für meine Dissertation.

Heidelberg, 1. März 1962